

## 자가연골세포와 PLA-coated PGA 복합체를 이용한 연골조직 재생

김 우 섭

중앙대학교 의과대학 성형외과학교실

### Engineering Autogenous Cartilage Using PLA Coated PGA Chondrocyte Complex

Woo Seob Kim, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Previous successful results of neocartilage formation using tissue engineering technique in immunocompromised nude mouse xenograft model were reported. For clinical application, autogenous cell is preferable to allogenic or xenogenic cell for circumvention of immune rejection. This study evaluates the feasibility of producing an engineered cartilage using autogenous chondrocytes.

Chondrocytes were isolated from the auricular cartilage of New Zealand White rabbit and seeded onto PGA polymer coated with polylactic acid in round pattern (diameter 0.7 cm, thickness 0.1 cm) at a concentration  $7 \times 10^7$  chondrocytes per  $\text{cm}^3$ . Each Autogenous Cell-polymer constructs were implanted subcutaneously into the left side of dorsum of twelve rabbits. Polymer templates not containing cells were implanted into the right side as a control. Twelve rabbits were sacrificed at the following intervals: 5 rabbits at nine weeks, 7 rabbits at twelve weeks

New autogenous cartilage formation which retained the approximate dimensions of original round polymer template in 11 of 12 cell seeded implants. Histological examination using hematoxyline and eosin stain revealed vast majority of implants developed into mature cartilage. This study opens up the possibility of autologous cell transplant to construct autogenous cartilage.

**Key Words:** Autogenous, Cartilage, Tissue engineering

Received October 21, 2004

Revised November 5, 2004

**Address Correspondence:** Woo Seob Kim, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, 65-207 Hangang-ro 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea, Tel: 02) 748-9561 / Fax: 02) 795-3873 / E-mail: kimws@cau.ac.kr

\* 이 논문은 2003년 중앙대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

## I. 서 론

선천성 기형이나 외상, 그리고 종양 절제술 후 생기는 연골결손의 경우 외에도 미용적 목적으로 조직 충진을 도모할 때, 자가 연골을 채취하여 목적에 따라 원하는 모양으로 조각하여 이식하는 방법이 사용되었다. 그러나 이러한 자가 연골 이식은 이식물의 흡수가 비교적 적고 생착시킬 수 있다는 장점에도 불구하고 채취할 수 있는 연골의 양이 한계가 있고, 공여부 반흔을 남기게 된다는 단점이 있다. 이를 해결하기 위해 고체실리콘, 고이텍스, 메드포어 등 다양한 인공보형물이 개발되어 재건 및 미용성형수술에서 자가 연골 대체물로 사용되어져 왔는데, 이러한 인공보형물들은 신체조직의 일부가 아닌 이물질로서 감염이나 노출 가능성이 있어 그 사용에 한계가 있다.

최근 세포 배양술과 생체재료공학의 발전으로, 연골세포를 생분해성 중합체에 삼차원으로 배양시켜 생체에 이식함으로써 연골을 재생시킬 수가 있게 되었고, 이러한 조직공학적 기법을 이용하여 결손조직을 복구하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1</sup> 그러나 조직 및 세포이식은 면역학적으로 자기조직에만 생착하며, 동종이나 이종이식은 생착이 불가능하기 때문에, 많은 연골조직공학 실험들은 면역성을 배제하기 위해 특수 처리해 만들어진 nude mouse, nude rat 등을 이용하여 동종, 이종세포를 이식하는 모델로 사용하고 있다.<sup>1,2</sup>

본 연구에서는 좀 더 임상적용에 근접한 모델로서, 자가 세포를 이용한 연골 재생을 위해 뉴질랜드산 가토의 연골에서 연골세포를 분리하여 원형모양의 PLA-coated PGA 중합체에 배양 한 후, 각 가토의 피하부위에 자가 이식하여 정상연골이 생성되는지 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 폴리머 제작

적절한 물리적 강도를 가진, 일정한 모양의 폴리머 형틀을 만들기 위해 methylene chloride를 용매로 하여 polylactic acid(Polysciences, Mw = 100,1000)를 2%(W/V) 농도

로 완전 용해시킨 다음, 15  $\mu\text{m}$  굵기의 섬유구조로 된 망사형 PGA 직포(Davis & Geck, Danbury, CT, USA)를 PLA 용액에 2분간 담궈 망사형 PGA에 용해된 PLA가 충분히 스며들게 하였다. 이렇게 만들어진 폴리머 지지체를 10일간 실온에 보관하여 휘발성 용매인 methylene chloride가 충분히 휘발된 다음 사용하였다(Fig. 1). 실험에 최종 사용하기 위한 원형의 지지형틀을 만들기 위해 직경 0.7 cm 편치를 이용하였고 지지형틀의 부피를 계산하기 위해 전자현미경을 이용, 중합체의 두께를 측정하고(0.1 cm), 중합체의 미세구조를 관찰하였다.

#### 나. 연골세포의 분리 및 계대배양

출생 후 1개월 된 뉴질랜드산 흰토끼(체중 300-500g) 15마리의 양쪽 이개연골을 무균적으로 채취하였다. 연골세포채취는 Klagsburn 방법을 이용하였다.<sup>4</sup> 연골막을 제거한 연골을 Phosphate buffer saline(PBS)에 3차례 세척 후 가능한 작은 연골절편으로 자른 후 연골절편을 0.3% Type II collagenase(Worthington, Biochemical, Freehold, NJ)를 첨가한 F-12 Medium(Gibco, Grand Island, NY) 30 ml에 넣고 37°C 온도로 12-16시간 교반한 후 멸균 나이론망 필터(250 $\mu\text{m}$ )로 걸러 분해되지 않은 연골절편은 제거하였다. 여과된 세포현탁액은 상온에서 1000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액은 버리고 침전물을 PBS로 3차례 세척한 후 연골세포를 얻었다. 얻어진 연골세포를 배양접시에 넣은 후 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하고 세포가 시험관 바닥에 딱 차게 자라면 계대배양을 위해 분주하였다. 두 차례 계대배양 후 trypsin-EDTA(Gibco, Grand Island, NY)로 처리하여 충분한 양의 연골세포를 얻었다. 생존연골 세포 수를 확인하기 위해 0.4% trypan blue로 염색하여 위상차 현미경 하에 hemocytometer로 세포 수를 확인하였다.

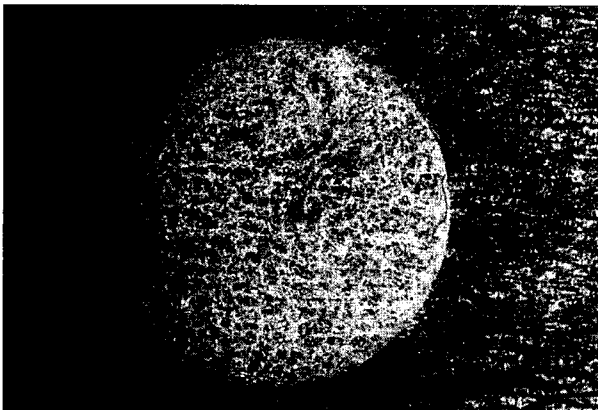


Fig. 1. Photomicrographs of PLA coated PGA polymer scaffolds used for cell transplantation.

#### 다. 연골세포-폴리머 복합체 구성

연골세포 배양을 위한 배지는 Hamm's F-12(Gibco, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum(FBS: Gibco, Grand Island, NY)와 ascorbic acid(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), L-glutamine(292  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 첨가하여 제조하였다.

만들어진 원형의 세포지지체는 Ethylene Oxide 가스로 멸균 소독하여 시험관에 넣고, 세포배양액에 24시간 담근 후 배양액을 제거하고, 분리한 세포를  $7 \times 10^7/\text{ml}$  농도로 세포지지체에 심은 후 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 매 2일마다 새로운 배지를 공급하였으며 주기적으로 세포의 성장 상태 및 오염 여부 등을 관찰하였다. 토끼 등의 피하부위에 이식할 때까지 2주간 배양하였다.

#### 라. 자가이식

연골조직을 채취한 토끼 12마리에 ketamine hydrochloride(40 mg/kg) 근육주사와 methoxyflurane을 흡입시켜 마취를 유도하였다. 감염방지를 위해 토끼 등을 깨끗이 면도하고, betadine을 이용하여 소독한 후, 등에 수직절개를 가하여 좌우측으로 피하 박리를 충분히 하고 좌측 피하에는 자가연골세포-폴리머 복합체를 이식하였고, 우측에는 대조실험군으로 세포가 포함되지 않은 폴리머만을 이식하였다.

#### 마. 결과 분석

이식 후 9주, 12주째 동물에서 채취한 조직을 육안으로 관찰한 후, 10% formalin에 고정하고 파라핀으로 포매하여 Hematoxyline-Eosin 염색으로 조직학적 소견을 관찰하였다.

### III. 결 과

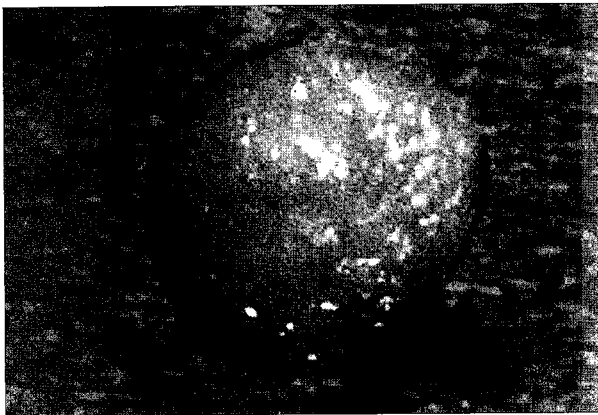
실험기간동안 모든 동물이 생존하였다. 1마리의 토끼에서는 감염되어 이식한 연골세포 부위에 연골이 생성되지 않았으나 나머지 11마리의 토끼에서는 이식부위의 감염이나 혈종, 이식물의 노출이나 돌출은 관찰되지 않았다(Table I).

육안적으로 관찰했을 때 각 실험기간 동안 동물의 좌측 등에 이식한 자가세포-폴리머 복합체는 지속적으로 그 형태를 유지하였고, 대조군으로 세포 없이 폴리머만 삽입한 우측부분은 3주부터 크기가 작아졌고 8주 후에는 관찰되지 않았다. 이식 9주와, 12주 후 동물을 희생시킨 후 새롭게 생성된 원형 연골편을 적출하였다. 새롭게 생성된 연골은 주위 조직으로부터 쉽게 분리되었으며, 폴리머 복합체의 원형 모양에 따라 원형의 신생연골을 형성하고 있었고, 세포를 심었던 폴리머 지지체보다 바깥으로 연골이 과생

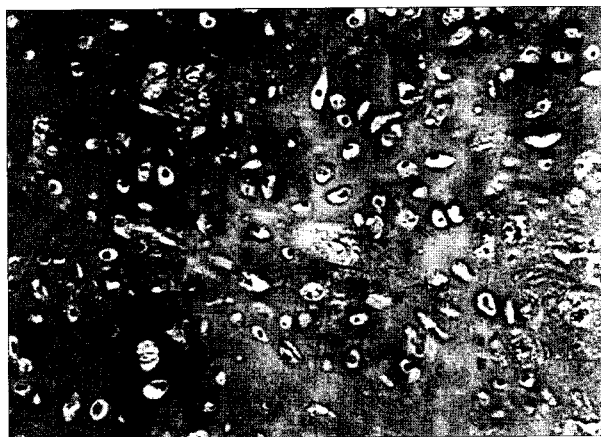
**Table 1.** Overall *In vivo* Results

Group	Positive No. for Cartilage/Total No. of Implant		
	9 weeks	12 weeks	Total
Experimental	4/5	7/7	11/12
Control	0/5	0/7	0/12

Statistically significant difference from control( $p < 0.01$ ) using a Fisher exact test



**Fig. 2.** New cartilage tissue formed from round shaped polymer templates seed with chondrocytes after 12 weeks implantation.



**Fig. 3.** Representative photomicrographs of hematoxyline and eosin stained histological sections taken from new cartilage after 12 weeks implantation ( $\times 200$ ) The new tissue resembled normal mature cartilage in all cases.

성된 경우는 없었다. 육안상, 9주와 12주 신생연골간의 차이는 없었다(Fig. 2).

H&E 염색에서도 새롭게 생성된 연골조직은 청분홍색을 띠는 콘드로이드 매트릭스 사이에 lacunae가 있고 그 안에 단핵으로 구성된 연골세포가 보이는 특징적인 연골조직 양상을 띄고 있었다. 9개월과 12개월의 신생 연골간

에 조직학적 소견의 차이는 없었다. 또한 조직 사이에는 부분적으로 미처 용해되지 않은 폴리머의 일부가 관찰되었다(Fig. 3).

## VI. 고 찰

다양한 원인으로 야기되는 조직결손의 복구를 위한 부작용이 없는 충전 재료의 개발은 재건 및 미용성형 수술분야에서 해결해야 할 중요한 과제이다. 의학적으로 안전하게 사용되어 온 자가 조직 이식은 그 공급량의 한계가 있고, 이를 대체하기 위해 상품화된 여러 가지 의학용 인공합성물질은 부작용의 가능성을 내포하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 일정한 모양을 가진 생분해성 중합체 틀에 세포를 붙여 새로운 조직생성을 유도하는 조직공학적 기법의 개발을 시작으로 많은 학자들에 의해 다양한 연구가 진행되고 있다.

다공성을 가진 생분해성 중합체는 연골세포가 부착되고 세포주변에 넓은 공간을 통하여 부착된 세포와 생체 환경 사이에 영양, 가스, 노폐물 교환이 용이하여 연골생성을 위한 적합한 소재로 많은 연구에 사용되고 있다. 또한 이 중합체 틀은 새로운 연골조직이 만들어지는 골격 역할을 수행하기 때문에 부착된 세포가 세포외 기질조직을 형성할 때까지는 유지되는 것이 바람직하다. 생분해성 재료로는 polyglycolic acid, polylactic acid, polylact-co glycolic acid, calcium alginate, chitosan, fibrin glue 등<sup>1,2,5,6</sup>이 조직공학적 연구에 많이 사용되는데, 본 실험에서는 다공성으로 장점이 많다고 알려진 polyglycolic acid로 제작된 부직포에 물리적 강도를 주기위해 polylactic acid를 코팅하여 만들어진 중합체를 이용하여, 원형모양의 중합체 틀을 만들어 사용하였다. 이렇게 만들어진 중합체는 충분한 다공성을 유지하고 있는 것을 볼 수 있어 연골조직 재생을 위한 연구에 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 한편 Puelacher 등은 연골세포-중합체를 이용한 연골세포 재생시, 최소한 연골이식세포밀도가  $2 \times 10^7/ml$  이상 되어야 하고  $5 \times 10^7/ml$  이 적합한 세포농도라고 보고하였다.<sup>7</sup> 본 실험에서는 연골 생성률을 높이기 위해  $7 \times 10^7/ml$ 의 세포 농도로

사용하였다

성형외과 영역에서 자가 연골이식은 코, 귀, 안검, 유두의 재건에 이용되고 미용 성형 분야에서도 다양하게 사용되고 있으나 수혜부의 모양에 맞는 연골 편을 얻기가 용이하지 않다. 조직공학에서 사용하는 이상적인 중합체의 조건은 다음과 같은 조건을 만족시켜야 한다고 밝혀져 있다. 첫째, 표면에 세포의 부착과 증식이 용이하고, 둘째, 복합체나 그 분해물질이 생체 내에서 염증이나 독성을 유발하지 않아야 하며, 셋째, 3차원 구조로 용이하게 제작이 가능하고, 넷째, 세포-복합체 상호반응과 세포기질 생성을 위한 충분한 공간을 확보하기 위하여 90% 이상의 다공성을 지녀야 하고, 다섯째, 세포지지체 역할을 한 후 완전히 흡수되어야 하고, 여섯째, 분해속도가 조직재생의 속도를 고려하여 조절될 수 있어야 한다.<sup>8</sup> 이러한 이상적인 조건을 완벽하게 갖춘 재료개발을 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 한편, 조직공학 기법을 이용하여 실제 임상에 사용하기 위한 다양한 기초연구들이 진행되고 있다. 이러한 연구들은 세포와 중합체의 친화도, 중합체의 물리학적 성상, 또 다양한 재료로 만들어진 중합체 등의 유용성을 보기 위한 것이다. 따라서 인체나 소, 돼지, 양, 토끼, 쥐 등에서 연골세포를 채취하여 면역거부 반응이 없는 Athymic nude rat이나, nude mouse 등에 이식하여 면역거부현상을 배제한 실험모델이 많이 사용된다. 그러나 실제 임상에서는 면역학적 거부현상으로 인해 이종이식이나, 타종이식은 장기간 면역억제제 등을 사용하여야 하는 등 많은 문제가 있어 자가이식이 흔히 이용되고 있다. 본 실험으로, 연골세포를 생분해성 중합체 틀에 붙여 자가 이식해 줌으로써 새로운 연골형성이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

## V. 결 론

본 연구는 원형의 PLA coated PGA 중합체에 가토의 자가세포를 분리, 배양한 후 생체에 이식하여 생성된 신생 연골에 대해 육안검사, 조직검사를 시행하여 그 특성을 관찰할 수 있었다.

첫째, 연골세포-PLA coated PGA 복합체를 토끼의 피하에 자가 이식하여 9주, 12주 후 이식물을 채취하여 육안적으로 관찰한 결과, 단단한 하얀색의 정상연골의 외형과 강도를 유지하고 있음을 알 수 있었고, 신생연골은 형틀로 사용한 폴리머와 같이 원형을 유지하고 있었다. 둘째, 이식편을 H&E 염색하여 조직학적으로 관찰한 결과 lacunae 속에 연골세포가 보이는 특징적인 연골 조직편 소견을 확인할 수 있었다. 셋째, 이 실험으로 면역 억제된 동물을 사용한 이종이식 모델과 마찬가지로 자가 연골세포를 이용하여도 신생연골 연골조직 형성이 가능함을 알게 되었다.

## REFERENCES

1. Vacanti CA, Upton J: Tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 21: 445, 1994
2. Vacanti C, Langer R, Schloo B, Vacanti JP: Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation *in vivo*. *Plastic Reconstr Surg* 88: 753, 1991
3. Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooner D, Upton J, Puelacher WC, Vacanti CA: Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg* 94: 233, 1994
4. Klagsburn M: Large scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58: 560, 1979
5. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP, Vacanti CA: Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg* 96: 1390, 1995
6. Sims CD, Buttler PEM, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ: Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 101: 1580, 1998
7. Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo BS, Mooney D, Vacanti CA: Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23: 49, 1994
8. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Brion RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Burlow SK, Langer R: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotech* 12: 689, 1994